

KR 2001063153

File 351:Derwent WPI 1963-2005/UD,UM &UP=200522

(c) 2005 Thomson Derwent

***File 351: For more current information, include File 331 in your search.**

Enter HELP NEWS 331 for details.

Set Items Description

--- -----

? S PN=KR 2001063153

S1 1 PN=KR 2001063153

? T 1/3,AB/1

1/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014202803

WPI Acc No: 2002-023500/*200203*

XRAM Acc No: C02-006430

Cpg oligodeoxynucleotide variant binding to dg repetitive sequence and having improved immune regulating activity and stability

Patent Assignee: GENEXINE INC (GENE-N)

Inventor: BAEK G H; LEE S U; SONG M G; SUNG Y C

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
KR 2001063153	A	20010709	KR 9960032	A	19991221	200203 B
KR 359753	B	20021109	KR 9960032	A	19991221	200330

Priority Applications (No Type Date): KR 9960032 A 19991221

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

KR 2001063153 A 1 C07H-021/00

KR 359753 B C07H-021/00 Previous Publ. patent KR 2001063153

Abstract (Basic): *KR 2001063153* A

Abstract (Basic):

NOVELTY - A CpG oligodeoxynucleotide variant which binds to deoxyriboguanosine (dG) repetitive sequence and has improved immune regulating activity and stability, where the oligodeoxynucleotide variant does not express toxicity in a living body and improves bind ability to immunocyte having scavenger receptor, and is thus useful to vaccine adjuvant for the prevention and treatment of infectious disease such as acquired immunodeficiency syndrome, hepatitis C type and chronic hepatitis, is new.

pp; 1 DwgNo 1/10

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C07H 21/00

(11) 공개번호 특2001 -0063153
(43) 공개일자 2001년07월09일

(21) 출원번호 10 -1999 -0060032
(22) 출원일자 1999년12월21일

(71) 출원인 주식회사 제넥신
서유석
경북 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 생명과학동

(72) 발명자 성영철
경상북도포항시남구지곡동교수아파트6동902호
이승우
경상북도포항시남구지곡동756남자기숙사11동110호
송만기
경상북도포항시남구지곡동대학원아파트4동1103호
백관혁
인천광역시남구학익동48 -1

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 면역조절능력 및 안전성이 증가되고 d G 연속서열이결합된 포스포다이에스터 C p G 올리고데옥시뉴클레오타이드 변형체

요약

본 발명은 면역조절능력이 증가된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 변형체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 면역조절능력을 갖는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드의 3' 말단에 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열을 결합시킴으로써 SR(scavenger receptor)을 갖는 면역세포에 특이적인 결합능을 향상시켜 Th -1 면역활성을 최대화하면서 인체에 대한 독성을 유발하지 않는 CpG ODN을 제공하며, 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 알레르기, 천식, 자가면역질환등의 면역치료제로 사용될 수 있을 뿐 아니라 후천성 면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrom, AIDS) 및 C형 만성간염 등의 감염성 질병들에 대한 예방 및 치료 백신의 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도
도 4a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN이 대식세포(도 1a)와 B 세포(도 1b)에서 IL -12의 분비에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고,

도 2는 3' 말단에 결합된 dG 연속서열의 길이에 따른 사이토카인 분비 효능성을 나타낸 그래프이고,

도 3a는 dG 연속서열이 결합된 ODN이 수상돌기세포의 표면에 결합하는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 3b는 dG 연속서열이 결합된 ODN이 수상돌기세포의 내부로 유입되는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 3c는 SR -A 리간드인 dG₂₀, 푸코이난, 덱스트란 설페이트와, SR -BI 리간드인 I.DL, CD36의 리간드인 올레산, Mac -1 리간드인 피브리노겐과 항 CD18 단일클론항체를 사용한 경쟁적 결합 분석을 통해 dG 연속서열이 결합된 ODN이 어떠한 세포 표면 수용체를 통해 세포 내로 유입되는지는 조사한 결과이고,

도 4a는 HIV 입자(particle)와 함께 dG 연속서열이 결합된 ODN을 포함하거나 포함하지 않은 상태로 면역반응을 유도하여 생체 내에서 dG 연속서열이 Th -1 면역반응을 유도하는지 여부를 면역글로불린의 양을 측정하여 조사한 결과이고,

도 4b는 마우스에 1826D, 1826T 및 M21과 gDE2t 단백질을 근육주사한 후 항 E2 IgG2a 역가를 측정한 ELISA 결과를 나타낸 것이고,

도 4c는 ODN들과 gDE2t 단백질이 함께 면역된 생쥐의 CD4 + T세포로부터 사이토카인(IL -4 및 IFN - γ)의 분비에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 면역조절능력이 증가된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 변형체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 면역조절능력을 갖는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드의 3' 말단에 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열을 결합시킴으로써 제거세포 수용체(scavenger receptor, 이하 SR이라 함)를 갖는 면역세포에 대한 특이적인 결합능을 향상시켜 보조 T 세포타입 -1(Th -1) 면역활성을 최대화하면서 인체에 대한 독성은 유발하지 않는, 백신 보조제 및 면역치료제로 유용한 CpG ODN 변형체에 관한 것이다.

CpG 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide, 이하 'CpG ODN'이라 한다.)는 선천성 및 후천성 면역반응을 모두 활성화시킬 수 있는 유용한 면역 조절제로 알려져 있다. 구체적으로 CpG ODN은 주로 항원 제시 세포들(antigen presenting cells, 이하 APCs라 함), 예를 들어 B 세포, 대식세포(macrophage) 및 수상돌기세포(dendritic cell)를 활성화시켜 생체내 면역증강에 중요한 사이토카인(cytokine)의 분비나 동시 -자극분자(co -stimulatory molecule)의 발현을 촉진한다는 사실이 생체의 실험을 통해 밝혀져 있다(Klinman, D.M.et al.,PNAS USA93, 2879 -2883, 1996; Krieger, A.M.et al.,Nature374, 546 -549, 1995; Jakob, T.et al.,J. Immunol.161, 3042 -3049, 1998; Sparwasser, T.et al.,Eur. J. Immunol.28, 2045 -2054, 1998). CpG ODN은 APC의 엔도솜(endosome)으로 유입되고 그 활성화에는 엔도솜의 성숙이 필수적으로 요구된다. 그러나 상기 CpG ODN이 면역증강 효과를 유도하는데 어떠한 생체내 신호전달 과정을 거치는지 또는 ODN의 CpG 서열을 인식하는 생체내 분자가 무엇인지 등 자세한 기전은 아직 알려져 있지 않다.

한편 CpG ODN은 짧은 길이의 올리고뉴클레오타이드로서 생체 내에 풍부하게 존재하는 핵산 분해효소(nuclease)에 의해 쉽게 분해되어 그 활성을 잃는다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 CpG ODN의 골격을 포스포로티오에이트 결합(phosphorothioate backbone)으로 변형하는 방법이 사용되어 왔다(Stein, C.A. & Cheng, Y.C. Science 261, 1004 -1012, 1993). 이는 포스포로티오에이트 결합이 기존의 포스포다이에스터 결합(phosphodiester backbone)에 비해 핵산 분해효소에 대한 저항성이 높아 CpG ODN의 생체내 반감기를 증가시킬 수 있는 성질을 이용한 것이다. 그러나 최근 들어 포스포로티오에이트 골격 자체가 생체내에서 비특이적 면역활성을 강하게 유도하고, 그로 인해 생체에 독성을 유발한다는 사실이 보고됨(Monteith, D.K. et al., Toxicol. Pathol. 27, 307 -317, 1999; Wagner, H. Adv. Immunol. 73, 329 -368, 1999)에 따라 CpG ODN의 골격을 포스포로티오에이트 결합으로 변형시키는 방법은 안전성에 있어 문제점을 드러내고 있다.

이에 따라 본 발명자들은 CpG ODN의 면역활성은 극대화하면서 인체에 해로운 비특이적 면역반응을 최소화할 수 있는 새로운 CpG ODN 변형체를 찾기 위해 연구한 결과, 포스포다이에스터 CpG ODN의 3' 말단에 일정한 길이의 데옥시리보구아노신 연속서열(dG run)을 결합시키면 B 세포, 대식세포 및 수상돌기세포와 같이 제거세포 수용체(scavenger receptor, 이하 SR이라 함)를 발현하는 면역세포로의 특이적인 전달을 가능하게 할 뿐 아니라, 생체내에서 보조 T 세포 -1(Th -1) 면역반응을 극대화하고, 핵산 분해효소에 의한 CpG ODN의 분해를 억제하며 포스포로티오에이트 골격과는 달리 인체 내에서 독성을 나타내는 비특이적 면역반응을 최소화할 수 있음을 알아냄으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 Th -1 면역활성을 극대화하면서, 인체에 독성을 나타내는 비특이적 면역반응을 최소화한 포스포다이에스터 CpG ODN 변형체를 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 SR을 갖는 면역세포에 특이적인 결합능이 증가된 CpG ODN 변형체를 제공하는 것이다.

나아가 본 발명의 목적은 상기 CpG ODN 변형체를 백신 보조제 및 면역치료제로 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 3' 말단에 데옥시리보구아노신 연속서열(dG run)이 결합된 것을 특징으로 하며 CpG 모티프를 갖는 포스포다이에스터 올리고데옥시뉴클레오타이드(oligodeoxynucleotide, 이하 'ODN'이라 함) 변형체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN 중 Th -1 면역활성을 특이적으로 유도하는 서열번호 2, 9, 14, 16 또는 18로 기재되는 염기서열을 갖는 CpG ODN 변형체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN을 백신보조제 및 면역치료제로 사용하는 용도를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 명세서에서 'ODN'이라 함은 면역반응을 활성화할 수 있는 11~26 nt 길이의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 의미하며, 특히 'CpG ODN'은 면역조절능력을 나타내는 CpG 모티프(5' Purine Purine CpG Pyrimidine Pyrimidine 3')를 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 말한다.

'dG 연속서열'이란 데옥시리보구아노신이 최소한 4개 이상 연속적으로 포스포다이에스터 결합으로 CpG ODN에 연결된 형태를 지칭한다.

본 발명에서 p19 ODN 서열은 이미 공지된 pUC19 플라스미드의 amp^r 유전자에서 유래된 것으로(염기순서 2293에서 2312), 본 발명의 실시예에서는 GenoTech(대전시, 대한민국)사에 합성을 의뢰하여 제조하였다. 다른 ODN들은 p19 및 이미 활성이 알려진 ODN 서열에 dG 연속서열을 3' 말단에 결합시킨 채로 합성해서 쉽게 얻을 수 있다.

포스포로티오에이트 결합을 갖도록 제조된 ODN은 세포내에 존재하는 핵산분해효소의 공격으로부터 보호되어 생체내에서 ODN의 반감기를 연장시키는 역할을 한다. 그러나 포스포로티오에이트 결합 자체에 의한 비특이적 면역반응의 유발로 인해 안전성에 많은 문제점을 갖고 있다. 실제로 본 발명자들이 포스포로티오에이트 결합을 갖는 ODN(50 μ g)을 알루미늄 하이드록사이드로 처리하여 CHO에서 유래한 gDE2t 5 μ g와 함께 쥐에 주사해본 결과, 주사부위에서 육종(granuloma)이 발생하는 것을 확인하였다. 반면, 포스포다이에스테르 결합을 갖는 CpG ODN들은 시험관 내(in vitro) 실험은 물론 생체내(in vivo) 실험에서도 인체에 해로운 비특이적 면역반응은 나타내지 않았다. 이는 핵산분해효소에 대한 공격가능성 및 효율 면에서 상당히 낮은 정도로 비특이적 엔도사이토시스(endocytosis)를 통해 면역세포에 작용하기 때문인 것으로 여겨진다. 이와 같이 포스포로티오에이트 결합이 갖는 안전성의 문제와 공지의 포스포다이에스테르 결합이 갖는 낮은 면역원성의 문제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 dG 연속서열을 포스포다이에스테르 결합을 갖는 CpG ODN의 3' 말단에 결합하여 면역원성과 안전성의 문제를 동시에 해결하였다.

본 발명에서 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시켜 그 면역반응 유도활성을 증가시킬 수 있는 CpG ODN들은 서열번호 2의 p19, 서열번호 9의 M16, 서열번호 14의 M21 및 서열번호 16의 M22인 것이 바람직하다. 5' 말단에 dG 연속서열이 결합된 경우에는 dG 연속서열이 결합되지 않은 경우보다 더 낮은 정도로 수상돌기세포에서 인터루킨 -12(interleukin -12, 이하 IL -12라 함)가 분비되어, 오히려 5' dG 연속서열은 CpG 모티프에 의해 유도되는 IL -12의 분비능력을 억제한다. 또한 5' dG 연속서열은 3' dG 연속서열과 마찬가지로 연속서열이 없는 경우에 비해서는 세포 결합 및 세포 내로의 유입 면에서 더욱 효과적이지만, 3' 말단의 경우가 5' 말단에 dG 연속서열이 결합한 경우보다 세포 결합 및 세포 내 유입면에서 더욱 효과적이다. 이러한 세포 결합 및 세포내 유입효과는 dG 연속서열을 다른 염기, 예를 들어 dC 연속서열로 치환한 경우에는 사라지는 것으로 보아 dG 연속서열의 특이적인 효과임을 알 수 있다.

특히 IL -12의 생산면에서 수상돌기세포는 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 가장 바람직한 목표가 되는 데, 이는 수상돌기세포가 생체내에서 면역반응 유도에 핵심적이며 IL -12는 Th -1 면역반응의 유도에 중요한 역할을 하기 때문이다. 수상돌기세포는 대식세포에 비해 ODN에 대한 결합력이 4배 이상 낮지만, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 대식세포보다 약 50배 이상 IL -12를 많이 생산한다.

본 발명의 실시예에서 생쥐의 지라로부터 분리한 수상돌기세포에 처리한 생체외 실험(in vitro)결과 CpG ODN들은 수상돌기세포를 자극하여 종양괴사인자 - α (tumor necrosis factor - α , 이하 TNF - α 라 함) 및 IL -12를 높은 수준으로 분비하도록 하였다. 또한 복강 내 대식세포나 B 세포에서도 IL -12를 분비하도록 유도하였다. 이러한 효과는 오직 CpG ODN들의 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 경우에만 나타나는 것으로 5' 말단에 결합한 경우에는 이를 관찰할 수 없었다.

한편, 면역세포의 표면에 존재하는 수용체 중 어떠한 수용체에 의해 dG 연속서열이 결합된 ODN의 세포 결합이 이루어지는지 실험하기 위해 다양한 리간드를 사용하여 경쟁적 결합양상을 조사한 결과, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 ODN의 세포 결합은 SR -A에 특이적인 리간드에 의해서만 저해되었으며, 이로부터 dG 연속서열이 결합된 ODN이 SR -A 리간드 특이성을 갖는 수용체를 경유하여 세포내로 유입됨을 알 수 있다.

본 발명에 의해 제조된 dG 연속서열을 갖는 CpG ODN들은 4개의 가닥으로 이루어진 나선구조(four-stranded helix)인 테트라플렉스(tetraplex) 구조를 만들어서 항원제시세포의 SR에 선택적으로 결합하고 그 결과 세포내의 CpG ODN들의 농도를 증가시킬 것으로 예상된다. 이러한 테트라플렉스 구조는 dG 연속서열에 의해 만들어지는 G-사중체(G-quartet)에 의해 안정화된다고 알려져 있으며, dG 연속서열과 결합한 CpG ODN이 APCs와 결합하고 유입되는 효율에 영향을 미친다. SR과의 결합에 의한 수용체 신호는 사이토카인의 생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 말레이일-BSA(maleyl-bovine serum albumin)가 SR에 결합하면 생쥐의 대식세포에서 TNF- α 유전자의 전사가 촉진됨이 보고되어 있다. 그러나 이와는 반대로 골수세포에서 유래한 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 IL-12의 생산은 저해된다는 보고도 있다. 한편, 본 발명에서 단순히 G-사중체 자체만이 SR과 결합해서는 TNF- α 및 IL-12와 같은 사이토카인의 생산이 증가되지 않는 것으로 보인다. 이러한 사실은 dG₆ 연속서열은 갖고 있지만 CpG 모티프가 존재하지 않는 M1 또는 M16GC에 의해서는 전혀 사이토카인의 생산이 유도되지 않는 것으로부터 알 수 있다. 따라서 증가된 면역활성을 나타내도록 하기 위해서는 dG 연속서열이 ODN의 3' 말단에 결합하는 것은 물론 ODN 자체가 CpG 모티프를 갖는 것이 중요하다.

dG 연속서열의 길이는 최소한 테트라플렉스 구조를 이룰 수 있도록 적어도 4개의 연속적인 dG가 결합된 dG 연속서열이 필요하며, dG가 6개 결합한 경우가 IL-12의 분비에 가장 효과적이다. dG 연속서열의 길이가 계속 증가하는 경우 IL-12의 분비정도는 큰 차이가 없으나, TNF- α 의 경우에는 dG가 15개 결합한 경우에 가장 높은 분비정도를 나타낸다. 따라서 생체내에서 과량의 TNF- α 분비가 독성을 나타낼 수 있으므로 dG 연속서열의 길이는 최소한 4개 내지 15개 이하로 이루어지는 것이 바람직하다.

한편, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 5' 또는 3' 말단의 염기 결합을 포스포로티오에이트 결합으로 변형함으로써 보다 증진된 사이토카인 분비활성을 나타낼 수 있다. 상기에서 포스포로티오에이트 결합으로 변형되는 것은 5' 또는 3' 말단에서 1~3 개의 염기결합을 변형시키는 것이 바람직하다.

보다 바람직하게는 양쪽 말단에서 2개의 염기결합을 변형시킨 서열번호 18의 M21E를 이용할 수 있다.

본 발명의 실험예 8에 따르면, 3' 말단에 dG 연속서열이 도입된 포스포다이에스터 CpG ODN의 생체내 핵산 분해효소에 대한 저항성을 더욱 증가시키기 위해 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 양쪽 말단에서 두 개의 염기결합을 포스포로티오에이트 결합으로 변형하여 수상돌기세포에서의 사이토카인 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 구체적으로 수상돌기세포에서의 IL-12 분비 유도 능력이 가장 뛰어난 M21의 양쪽 말단의 두 개의 염기를 각각 포스포로티오에이트 결합으로 치환한 뒤 생체와 실험을 통해 사이토카인 분비능력을 1826T 및 M21과 비교하였다. 그 결과 양쪽 말단 두 개의 염기에 포스포로티오에이트 결합이 도입된 CpG ODN은 포스포다이에스터 결합만으로 이루어진 M21보다 높은 IL-12 분비능력을 보임은 물론 모든 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 이루어진 1826T보다도 높은 수준으로 IL-12 분비 자극활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 양쪽 말단에만 포스포로티오에이트 결합을 도입함으로써 사이토카인 분비 자극활성을 더욱 높이고 핵산 분해효소에 대한 저항성을 더욱 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

본 발명에 의해 제조된 CpG ODN들은 백신 보조제(vaccine adjuvant) 및 면역치료제로 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 알레르기(allergy), 천식, 자가면역질환 등의 면역치료제 또는 AIDS, C형 만성 간염 등의 감염성 질병들에 대한 예방 및 치료 백신의 보조제로 이용될 수 있다. 이때 면역반응을 유도하고자 하는 항원과 상기 ODN들은 0.1 ~ 2.5 mg/kg의 양으로 2 ~ 4주 간격으로 2 ~ 3 번 투입되는 것이 바람직하다. 또한 항원에 대한 ODN의 비율은 0.2 ~ 10 인 것이 바람직하다. 항원들은 인체에 사용될 수 있는 백신 보조제인 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide)와 함께 혹은 단독으로 면역할 수 있고 근육주사(intramuscular) 또는 피하주사(subcutaneous)의 방법으로 투여될 수 있다. dG 연속서열의 3' 결합에 의해 효능성이 증가된 ODN M16, M21은 각각 생쥐에서 Th-1 면역반응인 IgG2a 생성 및 CD4⁺ T 보조세포로부터 높은 인터페론- γ /인터루킨-4(IFN- γ /IL-4) 분비 비율을 나타낸다.

이하 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 > dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 CpG ODN들의 제조

dG 연속서열의 효과ful 포스포다이에스터 골격(phosphodiester backbone)을 갖는 CpG ODN에서 규명하기 위하여 데 옥시리보구아노신(deoxyriboguanosine) 연속서열로 추정되는 염기서열(putative dG run, GGGGCG)과 CpG 모티브 인 AACGTT를 갖고 있는 적절한 염기서열을 탐색하였다. 그 결과 pUC19 내에 존재하는 암피실린 저항성 유전자인 *amp^r*의 2293 -2312번째 20개 염기로 이루어진 서열을 선택하였고, 이를 p19로 명명하였다. 또한 대조군으로 이미 면역활성 능력이 있다고 알려진 CpG ODN인 1826(Jakob, T.et al., J. Immunol.161, 3042 -3049, 1998)을 각각 포스포티오에이트 골격(phosphorothioate backbone, 이하 1826T라 함) 또는 포스포다이에스터 골격(phosphodiester backbone, 이하 1826D라 함)으로 GenoTech사에 합성을 의뢰하여 제조, 사용하였다. 상기 ODN들을 주형으로 하여 일부 염기가 치환되거나 dG 연속서열(dG run)을 3' 또는 5' 말단에 결합시킨 ODN들을 제조하였다.

상기와 같은 방법으로 하기 표 1에 나타난 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 하기 표 1에서 밑줄은 각각의 ODN에 존재하는 CpG 모티브 부위를 나타내고, 대문자는 포스포다이에스터 결합을 소문자는 포스포티오에이트 결합을 나타낸다.

[표 1]

본 발명에서 제조된 CpG ODN 들의 염기서열

명칭	서열번호	염기서열
1826T	1	5' tccatgacgttctctgacgtt3'
1826D		5' TCCATGACGTTCTCTGACGTT3'
p19	2	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
p19d	3	5' GGAAAACGTTCTTC 3'
M1	4	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
M7	5	5' GGAAAACGTTCTTCGCCCCG 3'
M13	6	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
M14	7	5' GGAAAACGTTCTTCGCCCCG 3'
M15	8	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
M16	9	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG 3'
M19	10	5' GGGGAAAACGTTCTTCGCC 3'
M26	11	5' GGGGGGAAAACGTTCTTCGC 3'
M27	12	5' GGGGGGGGAAAACGTTCTT 3'
M20	13	5' GGGGGGTCCATGACGTTCTGACGTT3'
M21	14	5' TCCATGACGTTCTCTGACGTTGGGGGG 3'
M12	15	5' CTTAACGTTCT 3'
M22	16	5' CTTAACGTTCTGGGGGG 3'
M23	17	5' GGGGGGCTTAACGTTCT 3'

< 실험예 1 > dG 연속서열이 생쥐의 지라(spleen)에서 분리한 수상돌기세포(dendritic cell)로부터 사이토카인의 분비에 미치는 영향

상기 실시예에서 제조된 CpG ODN들의 면역활성 정도를 비교분석하기 위하여 생후 약 6-8주정도의 C57BL/6 암컷 생쥐(대한실험동물센터)의 지라(spleen)로부터 수상돌기세포를 분리하여 CpG ODN들을 처리한 뒤 각각 종양괴사인자- α (TNF- α)와 인터루킨-12(IL-12)의 분비정도를 조사하였다.

수상돌기세포의 분리는 기존의 보고(Singh, Net al., J. Immunol. 160, 4849 -4880, 1998; Ridge, J.P. et al., Science 271, 1723 -1726, 1996)에 약간의 변형을 통해 이루어졌다. 즉, 마우스의 비장세포(splenocytes)를 조직 배양 플레이트에 90분간 부착시킨 후, 비부착성 세포(non-adherent cells)를 제거한 다음, 부착성 세포(adherent cells)에 10 ng/ml의 재조합 생쥐 GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, R&D System) 존재하에 하룻동안 배양하였다. 배양후 비부착성 세포 및 약한 부착성 세포들을 퍼콜 농도 구배(percoll density gradient)로 분리한 다음, 경계면으로부터 수상돌기세포들이 많은 저밀도 세포층을 수집하여 사용하였다. 1×10^5 개의 수상돌기세포에 각각의 CpG ODN들을 1.5 μ M의 농도로 처리하고 10시간과 30시간 뒤에 각각 배양액을 수거하여 분비된 TNF- α 및 IL-12 양을 상용 ELISA 키트들(Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development System, TOTAL MOUSE IL-12 DuoSet ELISA Development System; Genzyme)을 이용하여 측정하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

양성 대조군으로는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, 이하 LPS라 함)를 사용하였고, 음성 대조군으로는 배지만을 사용하여 IL-12 및 TNF- α 의 양을 정량하였다.

[표 2]

수상돌기세포에서의 사이토카인(IL-12, TNF- α) 생산에 미치는 영향

병칭	서열번호	IL-12(ng/ml)	TNF- α (pg/ml)
1826T	1	5.41 \pm 1.28	2768 \pm 628
1826D		0.37 \pm 0.07	134 \pm 58
p19	2	1.32 \pm 0.31	640 \pm 96
p19d	3	0.07 \pm 0.01	25 \pm 3
M1	4	0.05 \pm 0.01	27 \pm 3
M7	5	0.09 \pm 0.02	30 \pm 3
M13	6	0.07 \pm 0.01	20 \pm 1
M14	7	0.05 \pm 0.01	22 \pm 2
M15	8	0.08 \pm 0.02	36 \pm 5
M16	9	2.40 \pm 0.77	960 \pm 166
M19	10	0.13 \pm 0.05	39 \pm 6
M26	11	0.13 \pm 0.07	96 \pm 26
M27	12	0.07 \pm 0.03	64 \pm 19
M20	13	0.42 \pm 0.11	115 \pm 29
M21	14	3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176
M12	15	0.05 \pm 0.01	18 \pm 3
M22	16	0.88 \pm 0.17	408 \pm 55
M23	17	0.05 \pm 0.01	40 \pm 5
LPS		1.59 \pm 0.25	844 \pm 154
배지		0.07 \pm 0.01	27 \pm 4

상기 표 2에 나타나 있듯이 포스포로티오에이트 변형(1826T)이 포스포다이에스터(1826D)에 비해 월등히 뛰어난 사이토카인 분비를 나타냈다. 그러나 p19는 1826D에 비해 약 네 배 정도 높은 IL-12 분비를 보였다. 또한 이러한 높은 수준의 사이토카인 분비는 dG로 구성된 연속서열(GGGGCG)에서 일부 dG를 dC로 치환하거나(M7, M13, M14, M15), 제거했을 때(p19d) 현저하게 감소함을 알 수 있다. 또한 p19의 dG로 구성된 연속서열의 dC를 dG로 치환하였을 때(M16) 그 활성이 더욱 증가하였다. 이러한 dG로 구성된 연속서열의 효과는 서로 다른 염기서열 혹은 다른 길이를 갖고 있는 CpG ODN에서도 마찬가지로 나타났다. 즉, M21과 M22가 1826, M12에 비해 현저히 높은 TNF- α 및 IL-12 분비를 나타내었다. 특히 dG 연속서열을 5' 말단에 결합시킨 경우(M19, M26, M27)에는 사이토카인 분비에 효과가 없는 것으로 나타나 결론적으로 dG 연속서열의 효과는 CpG ODN의 3' 말단에 있을 때에만 선택적으로 나타나는 것임을 알 수 있다.

< 실험예 2 > 복강 대식세포와 B 세포에서 dG 연속서열의 효과

수상돌기세포와 마찬가지로 대식세포 또는 B 세포에서도 dG ODN이 사이토카인의 분비를 촉진하는지 알아보기 위하여 생쥐의 복강 대식세포 및 지라에서 얻은 B 세포에 대해 실험예 1과 같은 방법으로 실험하였다.

복강 대식세포는 생후 약 6~8주 정도의 C57BL/6 암컷 생쥐 (대한실험동물센터)의 복강을 배지로 세척하고 이를 조직 배양 플레이트에 접종하여 9시간 동안 배양한 뒤에 배지로 3회 세척하여 부착성 세포들만 분리, 사용하였다. 또한 B 세포는 생쥐의 지라에서 비부착성 세포들을 분리한 뒤 B 세포에 특징적인 세포 표면 표지(surface marker)인 CD19(complement differentiation 19)를 인식하는 마이크로비드(microbead, Miltenyl Biotech)를 결합시키고 이를 미니(mini)MACS 칼럼(Miltenyl Biotech)을 사용하여 분리하였다. 1×10^5 수의 대식세포와 2×10^5 의 B 세포에 각각 $3 \mu\text{M}$ 의 CpG ODN을 처리한 후 30시간 뒤에 그 배양액을 얻어 IL -12 ELISA를 수행하였다.

그 결과 수상돌기 세포에서와 마찬가지로 생쥐의 복강 대식세포(microphage)와 지라로부터 분리한 B 세포에 CpG ODN들을 처리하였을 때에도 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 ODN만 높은 정도로 IL -12를 분비하는 것으로 나타났다. 특히 M16과 M21은 다른 ODN에 비해 현저히 높은 IL -12 분비유도활성을 나타내었다(도 1a 및 1b 참조).

< 실험예 3 > 3' 말단에 결합된 dG로 구성된 연속서열의 길이에 따른 효능성 변화

p19의 dG로 구성된 연속서열(GGGGCG)을 제거한 p19d를 대조군으로 하여 그 3' 말단에 다양한 길이의 dG 연속서열을 결합시킨 다음, 수상돌기세포에서 사이토카인의 분비정도를 측정하였다. 구체적인 실험과정은 상기 실험예 1의 방법을 따랐다. 그 결과들도 2에 나타내었다.

도 2의 결과로부터 알 수 있듯이, 사이토카인의 분비에는 적어도 4개의 연속적인 dG로 이루어진 dG 연속서열이 필요하고, 특히 데옥시리보구아노신이 6개 결합한 dG₆일 때 IL -12의 분비가 가장 효과적인 것으로 나타났다. dG 연속서열의 길이가 계속 증가하는 경우 IL -12의 분비정도는 큰 차이가 없었으나, TNF - α 의 경우 dG₁₅일 때 가장 높은 분비정도를 나타내어 dG₆가 결합된 ODN에 비해 약 5배 정도 더 높은 값을 나타내었다.

이러한 결과로부터 3' 말단에 결합된 dG 연속서열의 길이에 따라 TNF - α 와 IL -12의 분비정도를 변화시킬 수 있음을 알 수 있다.

< 실험예 4 > dG 연속서열의 결합에 따른 ODN들의 세포 결합 및 세포내 유입정도 변화

(4 -1) dG 연속서열이 ODN의 세포결합에 미치는 영향

CpG ODN의 효과적인 활성을 위해선 세포 내로 많은 양의 ODN이 유입되어야 한다. 따라서 수상돌기세포에 결합하는 정도나 세포 내로 유입되는 정도가 dG 연속서열의 결합에 의해 어떻게 변화하는지 조사하였다.

용이한 관찰을 위해 CpG ODN의 3' 혹은 5' 말단에 형광물질인 플루오레신(fluorescein)을 결합시킨 fODN들을 이용하였다. 세포에 결합하는 fODN의 양은 1×10^5 의 수상돌기세포에 $5 \mu\text{M}$ 의 fODN들을 4. C에서 한시간 동안 처리한 뒤 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 결합하지 않은 fODN들을 제거하고 FACS(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 형광광도를 측정하였다. 세포 내로 유입된 fODN의 양은 1×10^5 의 수상돌기세포에 $1 \mu\text{M}$ 의 fODN들을 4. C에서 30분 처리하고 37. C에서 각각 1.5 또는 6시간 동안 배양한 후 세포막에 부착된 fODN을 제거하고 측정하였다. 각각의 ODN이 수상돌기세포에 결합하는 정도 및 세포내로 유입되는 정도를 평균형광강도(mean fluorescent intensity, 이하 MFI라 함)로 측정하되, 배지만 존재할 때의 MFI를 기준으로 하여 fM21이 존재할 때의 MFI의 증가정도를 상대적인 지수로 나타낸 결합지수(binding index)와 유입지수(internalization index)로 나타내었다.

그 결과들도 3과 같다. 즉, 3' 혹은 5'에 dG 연속서열이 결합된 경우 ODN의 세포 결합(도 3a) 및 세포 내 유입(도 3b)은 dG 연속서열이 없는 ODN들의 경우에 비해 현저하게 증가하였다. 한편 dG 연속서열이 3' 말단 위치에 있는 경우가 5' 말단 위치에 결합한 경우보다 세포 결합 및 세포내 유입 면에서 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 또한 이러한 효과는 dG 연속서열이 dC 연속서열로 바뀌면 사라지는 것으로 보아 dG 연속서열의 특이적인 효과임을 알 수 있다.

(4 -2) dG ODN과 결합하는 수용체의 탐색

dG 연속서열을 포함한 ODN들의 세포표면에 결합하는 능력이 어떠한 수용체에 의해 이루어지는가를 조사하기 위하여 기존에 여러 수용체에 결합한다고 알려진 리간드들을 함께 처리하는 경쟁적 결합 분석(competitive binding assay)을 수행하였다. 즉, SR -A의 리간드로 dG₂₀, 푸코이단(fucoidan, Sigma), 덱스트란 설페이트(dextran sulfate, Sigma)를, SR -BI의 리간드로 LDL(low density lipoprotein, Sigma)을, CD36의 리간드로 올레산(oleic acid, Sigma)을, Mac -1(CD11b/CD18, α M β 2)의 리간드로 피브리노겐(fibrinogen, Sigma)과 항 CD18 단일클론항체(Pharmingen) 등을 사용하였다. 우선 0.25mg/ml 농도의 리간드 각각과 10 μ M 농도의 dG₂₀ 을 1 μ M 농도의 fM21과 공동배양한 후, 결합된 fM21로부터의 MFI를 측정하여 각각의 리간드가 ODN의 세포결합에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 SR -A에 특이적인 리간드들만 dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 fM21 ODN의 수상돌기세포에의 결합을 저해할 수 있었다(도 3c참조). 이러한 결과는 dG 연속서열이 SR -A 리간드 특이성을 갖는 수용체를 경유하여 세포 내로 유입됨을 나타낸다.

< 실험에 5> 5' 말단에 결합된 dG 연속서열에 의한 사이토카인 분비 능력 저해

실험에 1의 결과에서 나타나듯이 5' 말단에 dG 연속서열을 결합한 경우는 수상돌기세포로부터 사이토카인 분비를 전혀 증가시키지 못했다(표 2; M19, M26, M27). 그러나 5' dG 연속서열도 테트라플렉스(tetraplex) 구조 형성이나 수상돌기세포 결합 정도는 dG 연속서열이 없는 ODN의 경우에 비해 현저히 높음을 알 수 있었다(실험에 4). 이러한 결과는 dG 연속서열의 작용이 CpG ODN의 어느 위치에 있느냐에 따라 변화될 수 있음을 나타낸다. 본 실험예에서는 dG 연속서열이 CpG ODN과 결합한 위치에 따른 영향을 조사하기 위하여 양이온성 리포솜(cationic liposome)인 리포젠TM (lipogeneTM, BodiTech, Korea)을 CpG ODN과 함께 수상돌기세포에 처리하여 세포 내로 유입되는 CpG ODN의 양을 dG 연속서열의 유무에 상관없이 동일화시킨 뒤 실험하였다. 또한, dG 연속서열의 위치에 따른 영향을 조사하기 위하여 2개의 CpG 모티프만을 갖는 서열번호 2의 1826D와 1개의 CpG 모티프만을 갖는 서열번호 16의 M12를 대조군으로 하여, 각각 3' 말단에 dG 연속서열이 결합한 CpG ODN(M21, M22)과 5' 말단에 dG 연속서열이 결합한 CpG ODN(M20, M23)이 수상돌기세포에서의 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 수상돌기세포에 0.3 μ M의 CpG ODN들을 3 μ g의 리포젠과 함께 상온에서 30분 배양한 혼합액을 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 그 뒤 배양액에 남아있는 리포젠 -ODN 혼합체를 제거하고, 다시 24시간 동안 더 배양한 뒤 배양액으로부터 IL -12의 양을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

dG 연속서열의 결합위치에 따른 사이토카인 분비 영향

명칭	dG run위치	IL -12(ng/ml) - 리포솜	TNF - α (pg/ml) - 리포솜	IL -12(ng/ml) + 리포솜
1826D	-	0.37 \pm 0.07	134 \pm 58	4.15 \pm 1.17
M21	3'	3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176	8.11 \pm 2.19
M20	5'	0.42 \pm 0.11	115 \pm 29	1.74 \pm 0.57
M12	-	0.05 \pm 0.01	18 \pm 3	1.68 \pm 0.33
M22	3'	0.88 \pm 0.17	408 \pm 55	7.89 \pm 3.21
M23	5'	0.05 \pm 0.01	40 \pm 5	0.86 \pm 0.25
* - : dG 연속서열이 결합되지 않음				

그 결과, 3' 말단에 dG 연속서열이 없는 경우도 리포솜과 함께 처리할 때 수상돌기세포로부터 높은 정도로 IL -12를 분비하게 한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 5' 말단에 dG 연속서열이 있는 경우(M20, M23)에는 오히려 dG 연속서열이 없는 경우(1826D, M12)에 비해 더 낮은 정도로 IL -12를 분비함을 알 수 있었다. 이 결과는 5' dG 연속서열은 오히려 수상돌기세포로부터 CpG 모티프에 의해 유도되는 IL -12 분비 능력을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

< 실험에 6> 3' 말단에 결합된 연속서열의 염기종류에 따른 영향

M16의 dG 연속서열 대신 데옥시리보아데닌 (dA), 데옥시리보사이토신 (dC) 및 데옥시리보티민 (dT) 으로 구성된 연속서열을 CpG ODN의 3' 말단에 결합시킨 후 (M16 -A, M16 -C, M16 -T), 각각의 CpG ODN이 단독으로 혹은 리포솜과 함께 전달될 때 수상돌기세포로부터 IL -12 및 TNF - α 의 분비에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[표 5]

연속서열의 염기 종류에 따른 영향

명칭	서열		TNF - α (pg/ml) - 리포솜	IL -12 (ng/ml) + 리포솜
M16	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG3'	2.40 \pm 0.77	960 \pm 166	4.76 \pm 1.65
M16 -A	5' GGAAAACGTTCTTCAAAAAA3'	0.05 \pm 0.01	25 \pm 2	5.56 \pm 1.10
M16 -T	5' GGAAAACGTTCTTCTTTTTT3'	0.06 \pm 0.01	29 \pm 3	5.11 \pm 0.88
M16 -C	5' GGAAAACGTTCTTCCCCCCC3'	0.06 \pm 0.01	45 \pm 8	4.35 \pm 0.52
M16 -GC	5' GGCCCCGCTTCTTCGGGGGG3'	0.08 \pm 0.02	31 \pm 2	0.15 \pm 0.03

그 결과, 리포솜 없이 단독으로 수상돌기세포에 처리된 경우 CpG 모티프를 갖는 동시에 dG 연속서열이 3' 위치에 결합한 M16만 dG 연속서열 대신 dA, dC 또는 dT 연속서열이 결합한 CpG ODN들 (M16 -A, M16 -T, M16 -C)에 비해 현저하게 높은 사이토카인 분비자극활성을 나타내었다. 한편 3 μ g의 리포솜과 함께 투여된 경우에는 비슷한 IL -12 분비양상을 나타내었으나, 이 경우에도 CpG 모티프의 존재가 면역활성 증가에 필수적인 것으로 나타났다. 이 결과는 3' 말단에 결합된 dG 연속서열은 CpG ODN들의 세포내로의 유입에만 관여하고, 세포내에서 사이토카인 분비에 관계된 신호전달에 있어서는 큰 작용을 하지 않는 것을 나타낸다.

< 실험예 7> 생체내에서 dG 연속서열 결합에 의한 CpG ODN의 면역활성 변화

(7 -1) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 면역반응 유발효과 (항원: HIV)

dG 연속서열에 의한 CpG ODN의 면역활성 능력이 생체내에서도 적용될 수 있는지를 조사하기 위하여 Balb/c 생쥐에서 dG 연속서열이 결합된 포스포다이에스터 CpG ODN에 의해 유발되는 면역활성을 조사하였다. 일반적으로 포스포로티오에이트 골격을 갖는 CpG ODN만이 항원과 함께 주입되었을 때 면역반응을 주로 Th -1 면역반응 쪽으로 유도한다고 알려져 있다. 따라서 본 실험예에서는 dG 연속서열을 3' 말단에 결합한 포스포다이에스터 골격을 갖는 CpG ODN이 이와 유사하게 면역조절을 할 수 있는지를 조사함으로써 dG 연속서열의 효과를 생체내에서 조사하였다.

알루미늄 하이드록사이드 (aluminum hydroxide, Sigma)로 미리 처리한 인간 면역결핍 바이러스 입자 [human immunodeficiency virus (HIV) particle] 5 μ g/mouse과 50 μ g/mouse의 M16 CpG ODN을 함께 혼합하여 6 -8 주령의 Balb/c 암컷 생쥐 (대한실험동물센터)에 피하주사로 주입하였다. 모든 생쥐는 첫 번째 면역 4주 뒤에 부스팅 (boosting)을 하고 그 후 2주 뒤에 체액성 면역반응을 ELISA 분석을 통해 조사하였다. ELISA 분석은 항 HIV IgG 반응을 특이적으로 관찰하기 위하여 HIV 입자를 항원으로 이용하였고, 양고추냉이 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase, HRP)가 결합되어 있는 항 -마우스 IgG, IgG1 및 IgG2a (Southern Biotechnology, USA)를 각각 이차 항체로 사용하였다. 발색반응은 테트라메틸 -벤지딘 (tetramethyl -benzidine, TMB) 용액을 기질 (Sigma)로 사용하여 수행하였다.

그 결과로도 4a에 도시하였다. 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 M16을 HIV 입자와 함께 처리한 경우 전체 면역글로블린 (IgG)와 대표적인 Th -1 면역반응인 IgG2a 반응 모두 확률적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 3' 말단에 dC 연속서열이 있는 경우나 CpG 대신 GpC가 있는 ODN (M16C, M16GC)들을 함께 주입한 경우 그 효과가 미미하였다 (도 4a참조). 이 결과는 M16 ODN이 Th -1 면역반응을 효과적으로 증가시켰음을 나타내고 그 효과는 M16의 CpG 모티프와 3' 말단의 dG 연속서열에 의존적임을 시사한다.

(7 -2) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 체액성 면역반응 유발효과 (항원: gDE2t)

일반적으로 포스포로티오에이트 골격을 갖는 CpG ODN만이 항원과 함께 주입되었을 때 면역반응을 주로 Th -1 면역 반응 쪽으로 유도한다고 알려져 있다. 따라서 dG 연속서열 결합에 의한 면역조절 효과를 더욱 상세히 조사하기 위하여 다음으로 이미 기존에 그 효과가 잘 알려진 포스포로티오에이트 골격의 ODN인 1826T를 비교군으로 하여 1826D와 1826D의 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시킨 M21의 효과를 비교 분석하였다. 항원으로는 C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV)의 당단백질인 E2 단백질에 헤르페스 심플렉스 (herpes simplex virus, HSV)의 당단백질 gD가 융합된 형태의 gDE2t를 사용하였다. 또한 ODN의 면역조절 효과를 보다 정확히 관찰하기 위하여 알루미늄 하이드록사이드 (alum)를 사용하지 않고 비교적 작은 양 (2 μ g/생쥐)의 CpG ODN을 주입하였다. 면역 방법은 중국 햄스터 난소 세포(CHO)로부터 분리한 5 μ g의 gDE2t 단백질을 2 μ g의 ODN(1826D, 1826T, M21)과 함께 근육주사를 통해 B alb/c 생쥐에 주입하고 역시 4주 뒤에 부스팅 (boosting)을 하고 그 후 2주 뒤에 체액성 면역반응을 조사하였다. ELIS A 분석은 항 -E2t IgG2a 반응을 특이적으로 관찰하기 위하여 CHO에서 유래된 Hgh -E2t 단백질을 항원으로 이용하였고 HRP가 결합되어 있는 항 -마우스 IgG2a를 이차 항체로 이용하였다. 그 결과들도 4b에 나타내었다.

대표적인 Th -1 면역반응인 IgG2a 역가를 조사하였을 때 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN인 1826D는 E2에 대해 매우 낮은 IgG2a 역가를 보였다. 그러나 포스포로티오에이트 골격으로 변형된 1826T는 기존의 보고와 마찬가지로 높은 IgG2a 역가를 나타냈다. 1826D의 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시킨 M21의 경우에는 1826D에 비해 약 50배 정도 높은 IgG2a 반응을 보였다. 이 결과는 상기 (7 -1)의 결과와 일치한다고 할 수 있다. 즉 dG 연속서열의 결합에 의해 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN의 Th -1 면역반응 유도 능력이 증가되었다.

(7 -3) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 세포성 면역반응 유발효과 (항원: gDE2t)

이를 더욱 자세히 조사하기 위해 면역된 생쥐의 지라로부터 CD4⁺ T 세포를 분리하여 활성화시켰을 때 분비되는 사이토카인을 조사하였다. 2×10^5 의 CD4⁺ T 세포에 중국 햄스터 난소세포 (chinese hamster ovary, CHO)에서 분리된 E2t 항원을 각각 1 또는 5 μ g/ml의 농도로 처리하고 37°C에서 5일 동안 배양하였다. 배양액으로부터 Th -1 면역반응의 대표적인 사이토카인인 IFN - γ 와, Th -2 면역반응의 대표적인 사이토카인인 IL -4의 분비정도를 비교함으로써 면역반응의 타입을 결정하였다. 도 4c에서 볼 수 있듯이 1826D에 비해 M21을 함께 주입한 경우 높은 IFN - γ /IL -4 비율을 보인다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 1826T를 주입한 경우도 관찰되었다. 즉, dG 연속서열의 결합으로 인해 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN의 면역조절 능력이 포스포로티오에이트 골격으로의 변형과 유사한 방식으로 면역반응을 Th -1 쪽으로 유도함을 알 수 있다.

< 실험에 8> ODN 양쪽 말단에 포스포로티오에이트 변형의 도입에 의한 사이토카인 분비 능력 향상

3' 말단에 dG 연속서열이 도입된 포스포다이에스터 CpG ODN의 생체내 핵산 분해효소 저항성을 더욱 증가시키기 위해 본 실험에서는 포스포다이에스터 CpG ODN의 양쪽 말단 두 개의 염기결합을 포스포다이에스터 결합에서 포스포로티오에이트 결합으로 변형하였다. 수상돌기세포에서 가장 높은 정도로 IL -12를 분비시킨 M21의 양쪽 끝 두 개의 염기를 각각 포스포로티오에이트 결합으로 치환한 뒤 (M21E) 생체의 실험을 통해 IL -12의 분비능력을 1826T 및 M21과 비교 분석하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 하기 표에서 소문자는 포스포로티오에이트 결합을, 대문자는 포스포다이에스터 결합을 나타낸다.

[표 6]

양쪽 말단을 포스포로티오에이트 결합으로 치환시 사이토카인 분비에 미치는 영향

명칭	서열번호	서열	IL -12(ng/ml)
1826T	1	5' tccatgacgttcctgacgtt3'	5.41 ± 1.28
M21	14	5' TCCATGACGTTTCCTGACGTTGGGGGC 3'	3.04 ± 0.57
M21E	18	5' tcCATGACGTTTCCTGACGTTGGGGgg 3'	6.03 ± 2.19

그 결과, M21의 양쪽 말단 두 개의 염기에 포스포로티오에이트 결합을 도입한 M21E는 M21에 비해 두 배 정도 높고 또한 수상돌기세포에서 가장 높은 IL -12 분비 능력을 보였던 1826T에 비해서도 더 높은 수준으로 IL -12 분비자극 활성을 나타내었다. 이 결과는 양쪽 끝 부분만 포스포로티오에이트 변형을 도입함으로써 사이토카인 분비자극활성을 더욱 높이고 핵산 분해효소 저항성을 더욱 증가시킬 수 있음을 보여준다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 변형된 포스포다이에스터 CpG ODN은 높은 T h -1 면역반응 유도활성을 보이며, 기존에 알려진 포스포로티오에이트 골격으로 변형된 CpG ODN과는 달리 생체내에서 독성을 나타내지 않아 안전성이 뛰어나므로 효과적인 백신 보조제 및 면역치료제로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

면역활성을 갖는 포스포다이에스터 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)에 있어서, 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열이 결합된 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 2.

제 1항에 있어서, ODN은 CpG 모티프를 갖는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 3.

제 1항에 있어서, dG 연속서열은 ODN의 3' 말단에 결합한 것으로 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4.

제 1항에 있어서, dG 연속서열은 4 내지 15개 이하의 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 최소한 4개 이상의 dG가 연속되어 있는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 5' 또는 3' 말단의 1~3 개의 포스포다이에스터 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 치환된 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6.

제 1항에 있어서, ODN은 SR(scavenger receptor)을 갖는 면역세포에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 수상돌기세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), B 세포를 포함하는 항원제시세포(antigen presenting cells)에 특이적으로 작용하는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 수상돌기세포로부터 IL -12, TNF - α 분비를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드.

청구항 9.

제 1항 또는 제 5항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 9, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18로 표시되는 염기 서열을 갖는 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드.

청구항 10.

제 1항의 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 하는 백신 보조제 또는 면역 치료제.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 다른 항원과 함께 추가적으로 사용되는 것을 특징으로 하는 백신 보조제 또는 면역 치료제.

청구항 12.

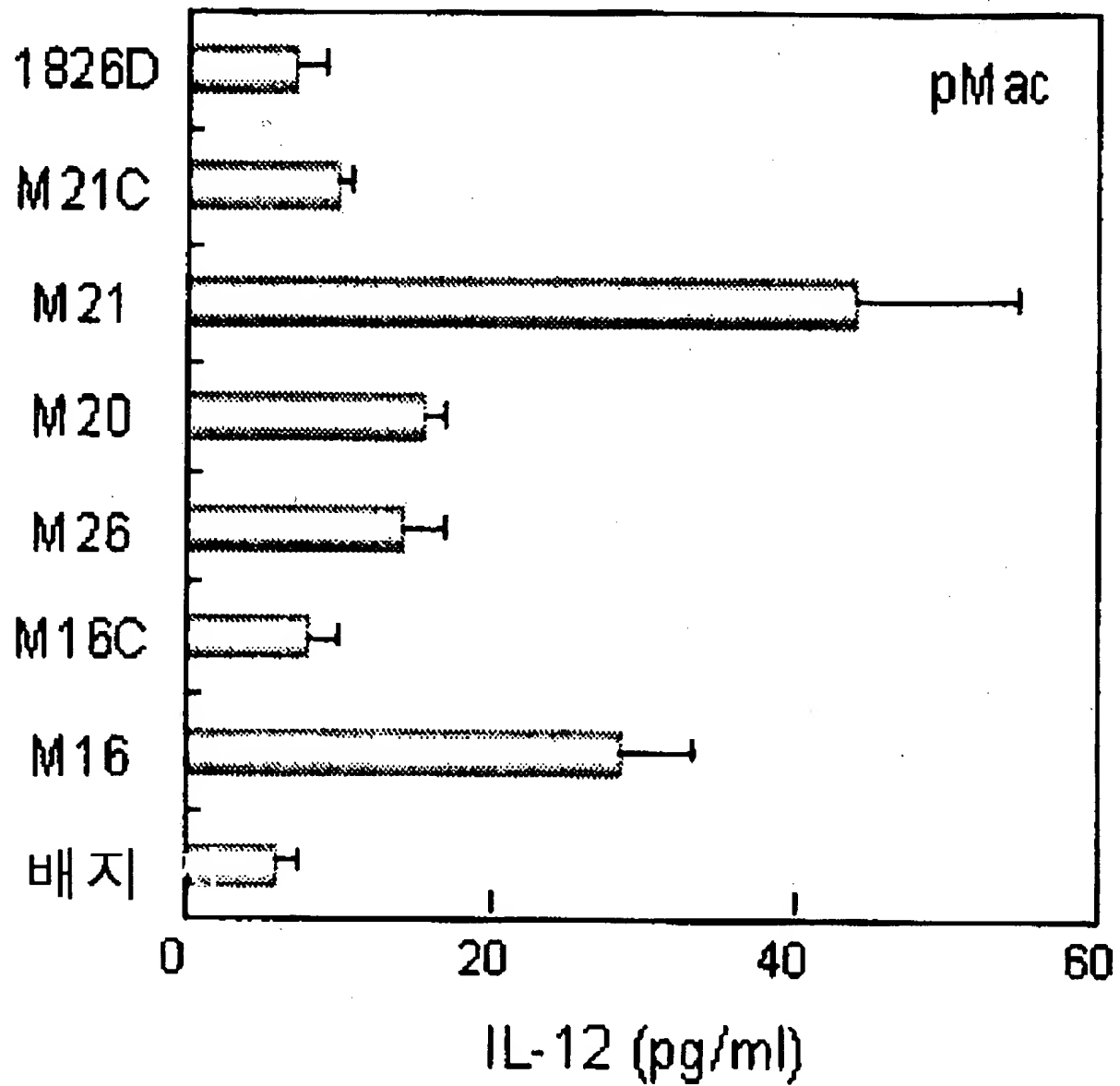
제 10항 또는 제 11항에 있어서, 상기 백신은 AIDS, 만성 C 형 간염 등의 질병을 예방 또는 치료를 위한 것임을 특징으로 하는 백신 보조제.

청구항 13.

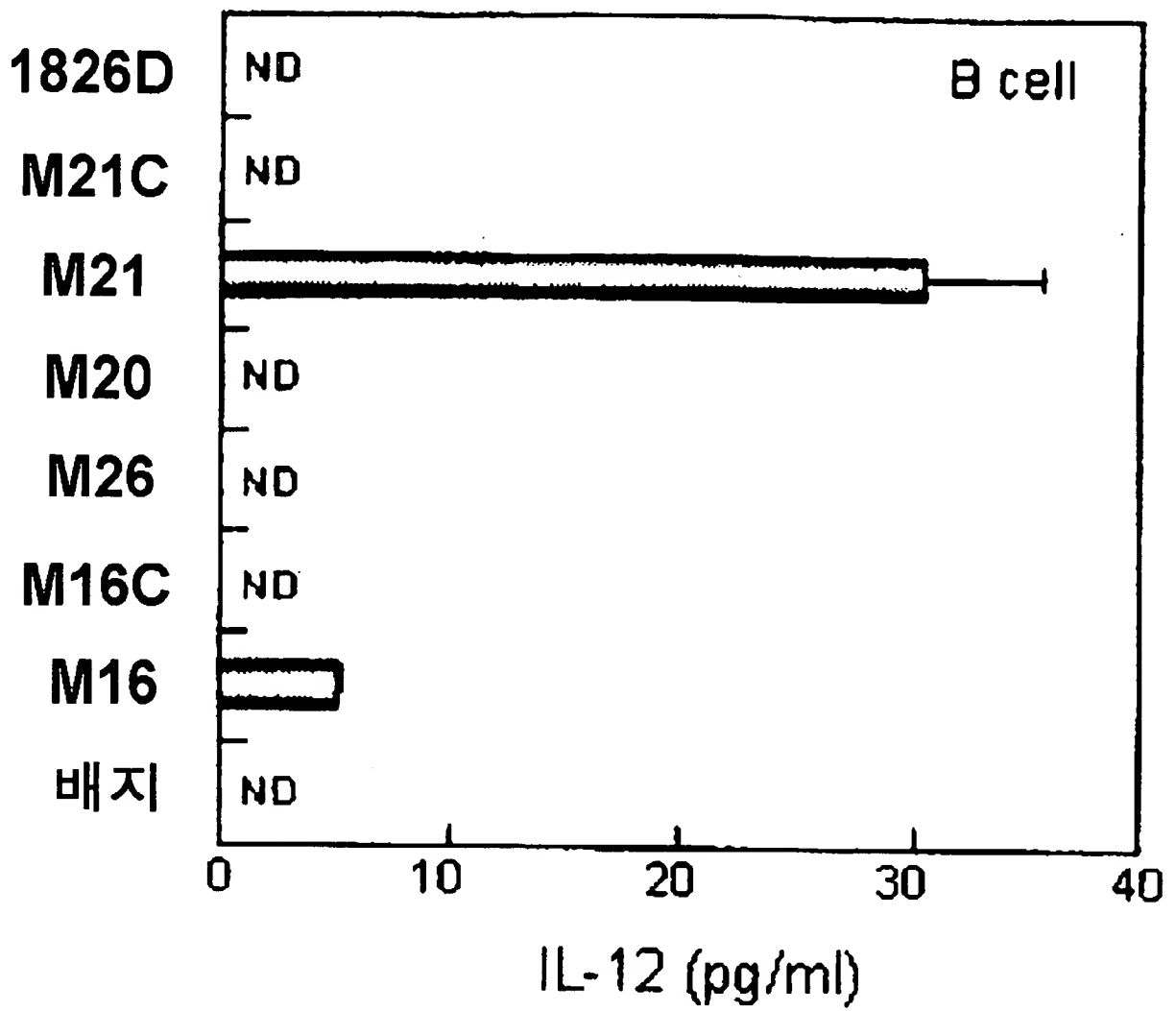
제 10항 또는 제 11항에 있어서, 상기 치료제는 알레르기, 천식, 자가면역질환의 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 면역치료제.

도면

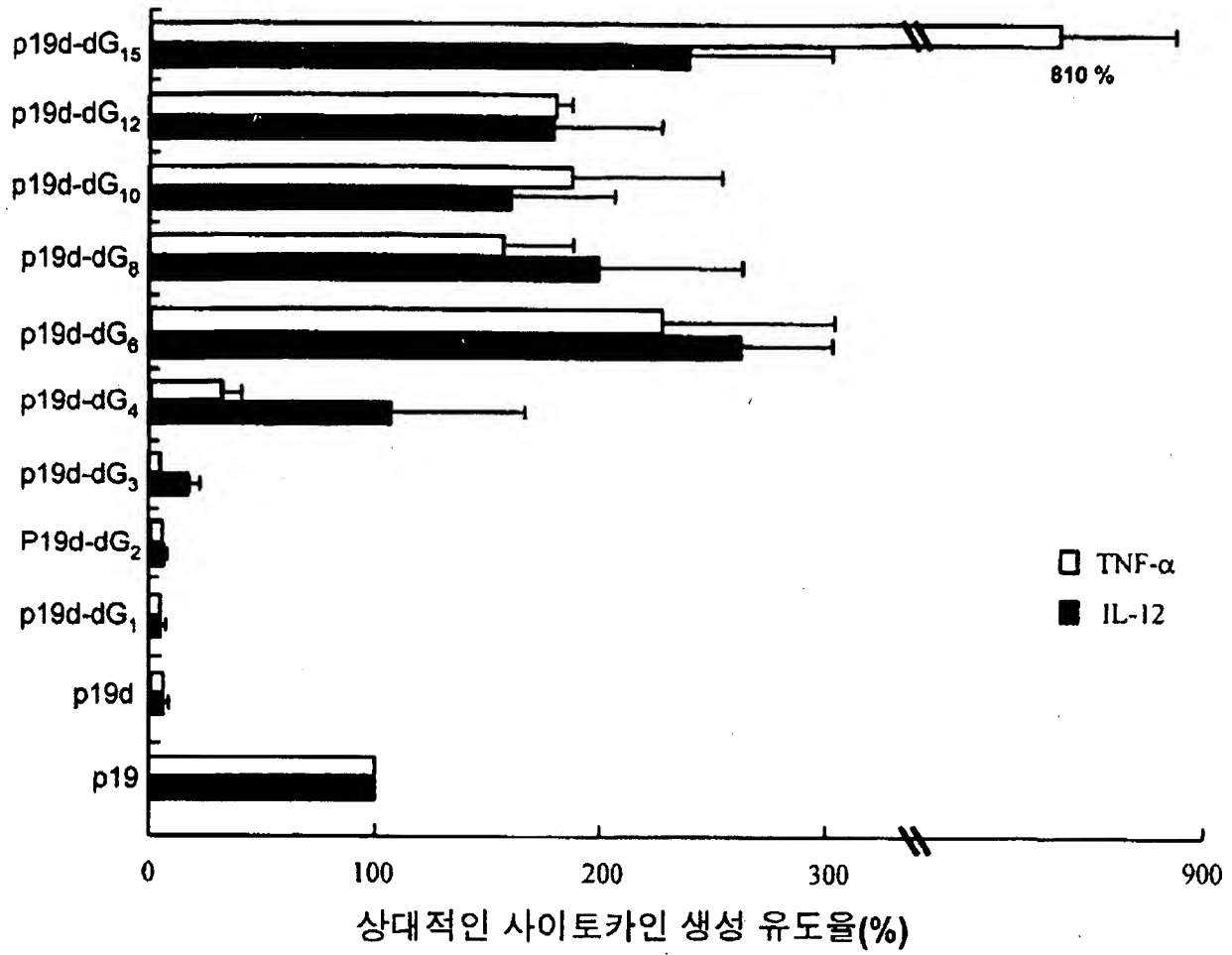
도면 1a



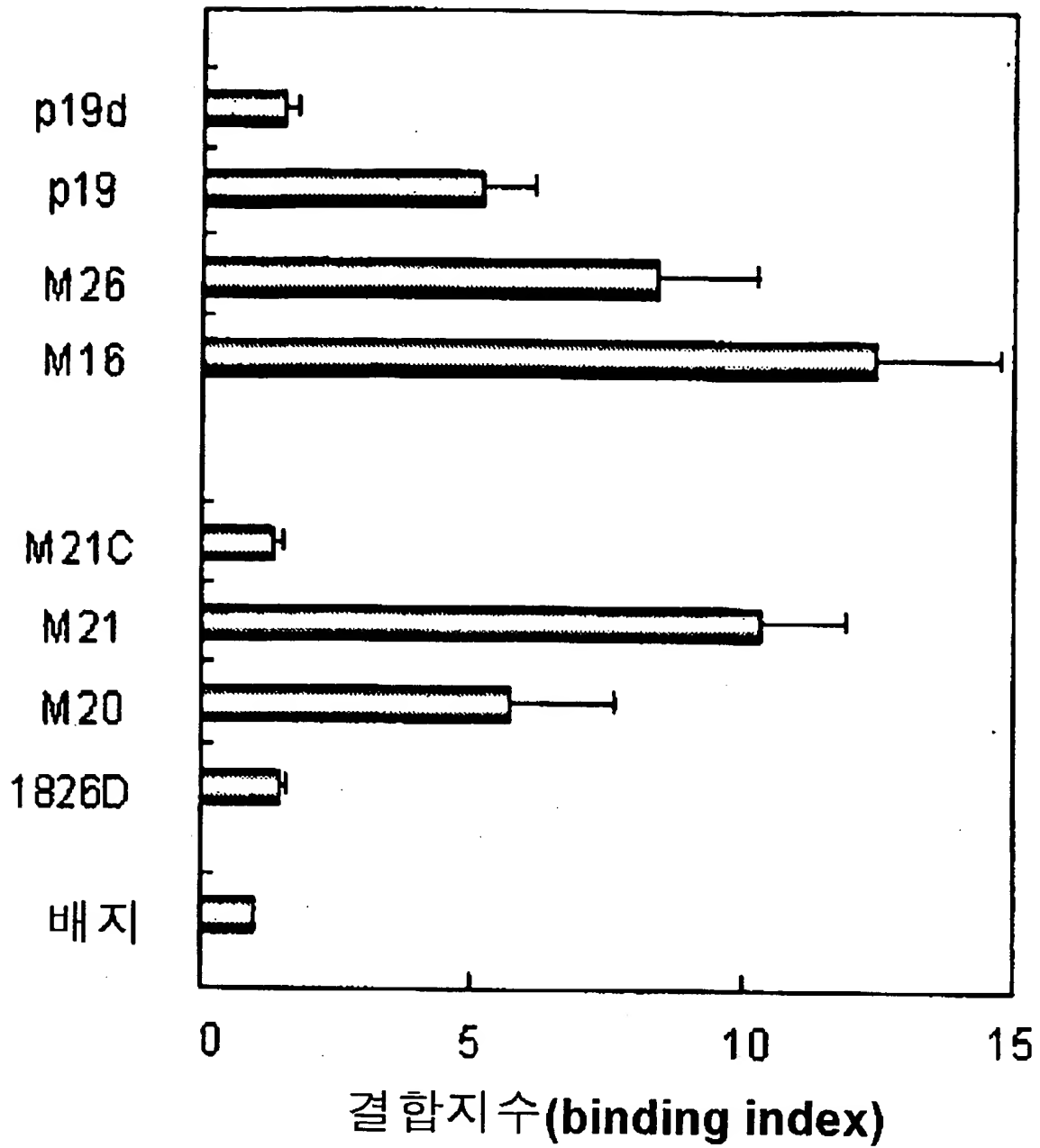
도면 1b



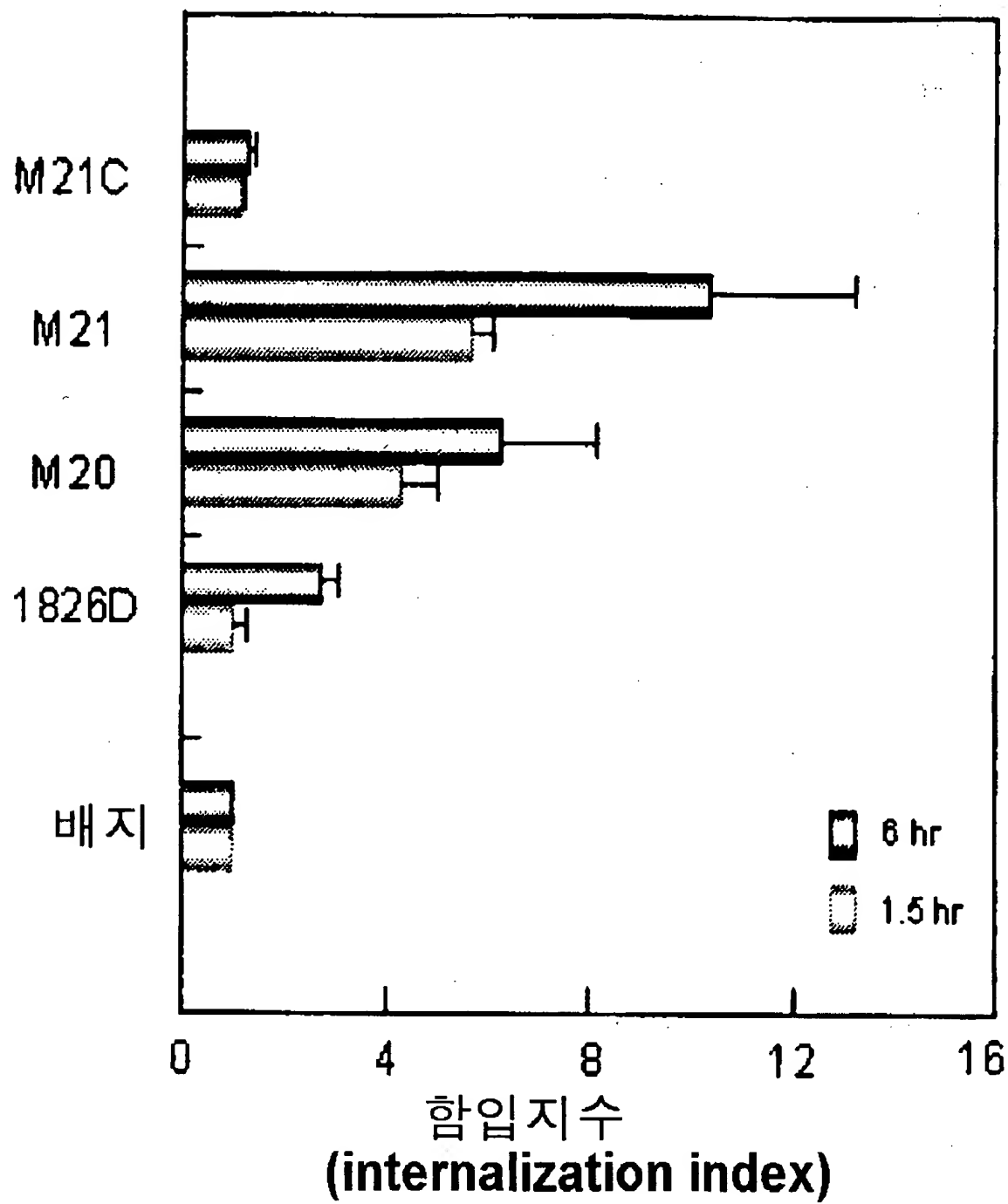
도면 2



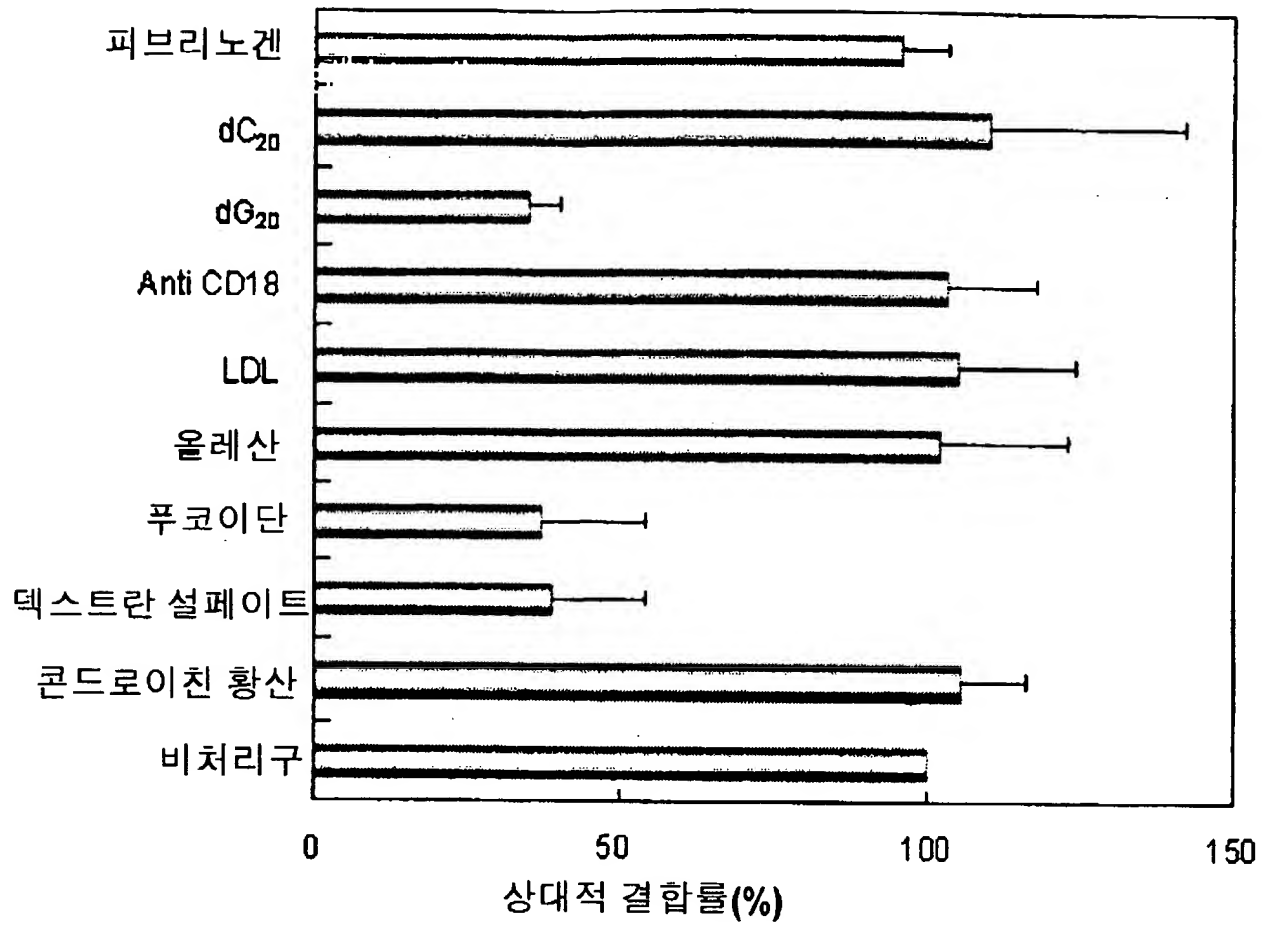
도면 3a



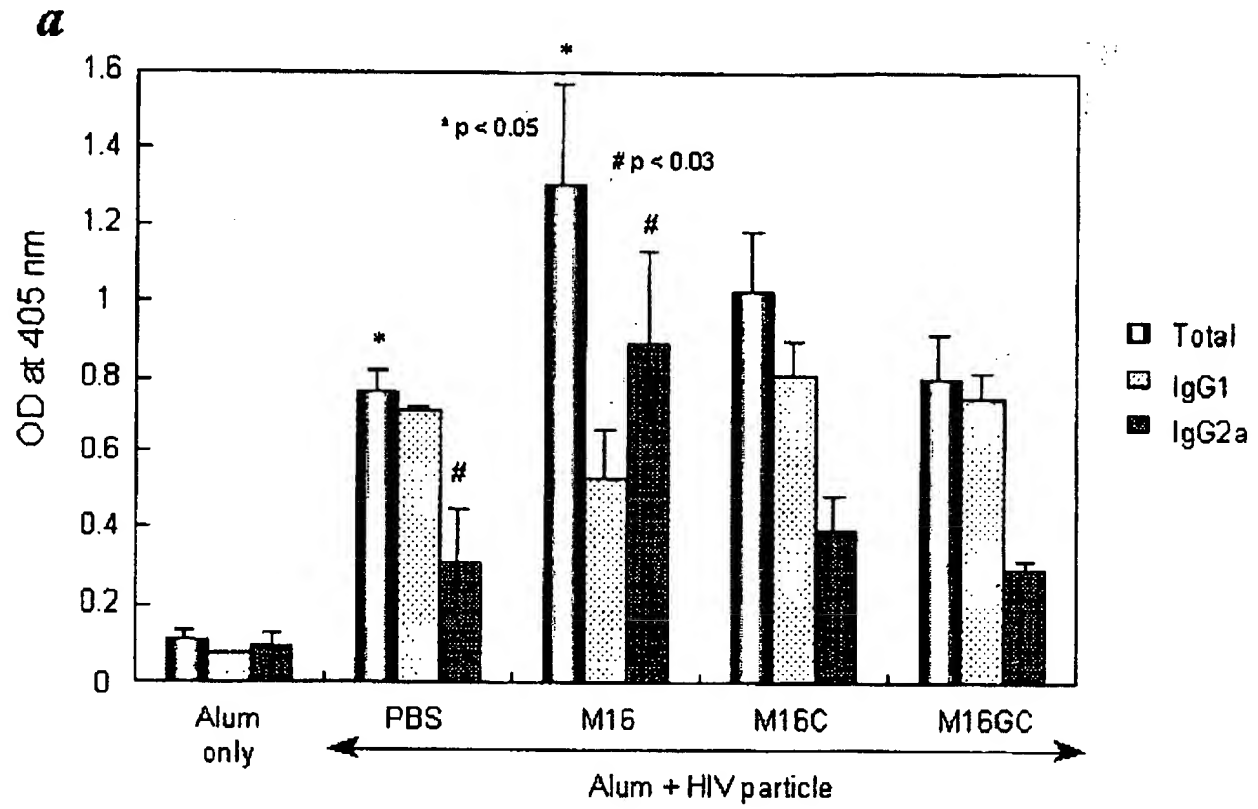
도면 3b



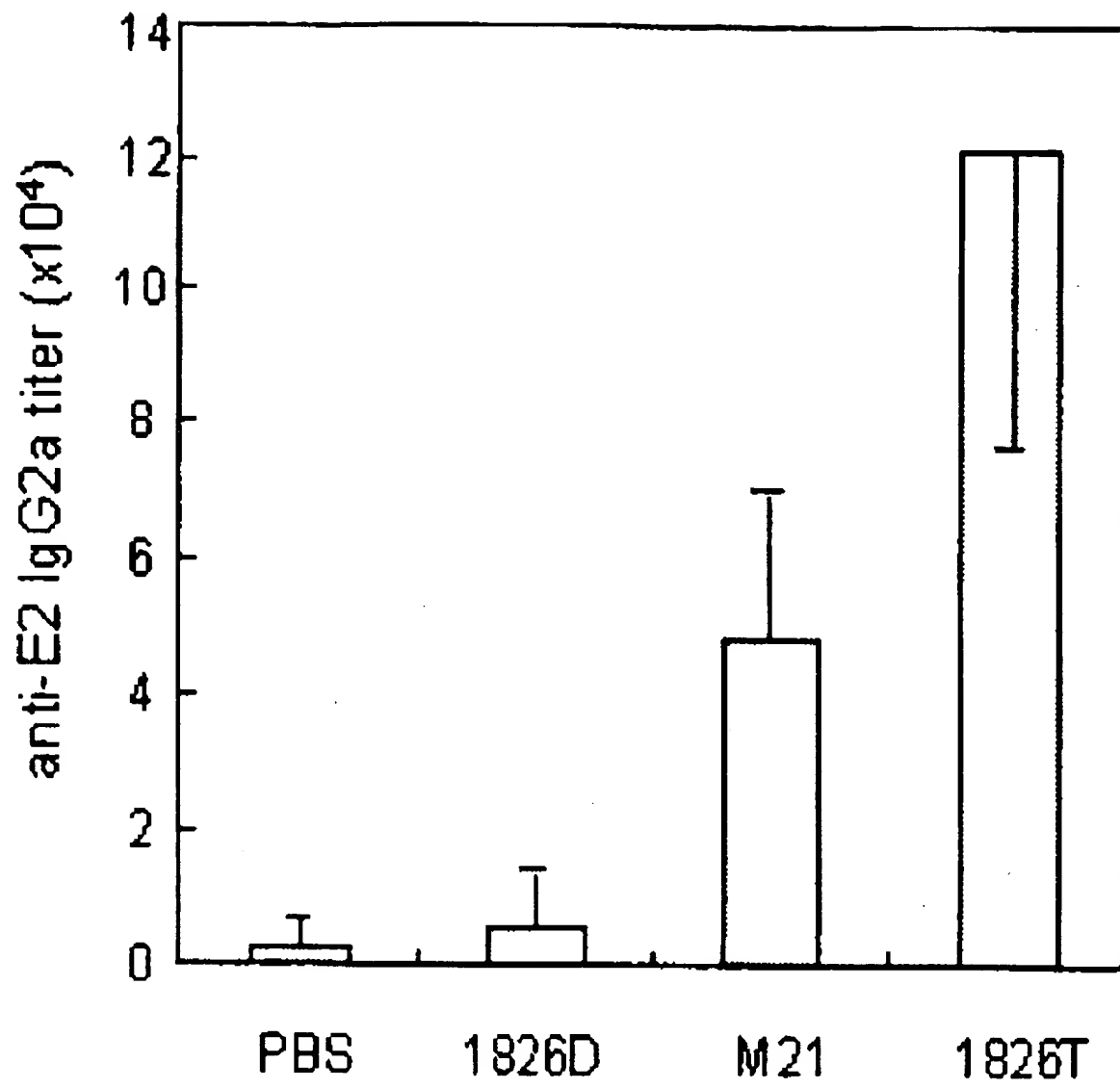
도면 3c

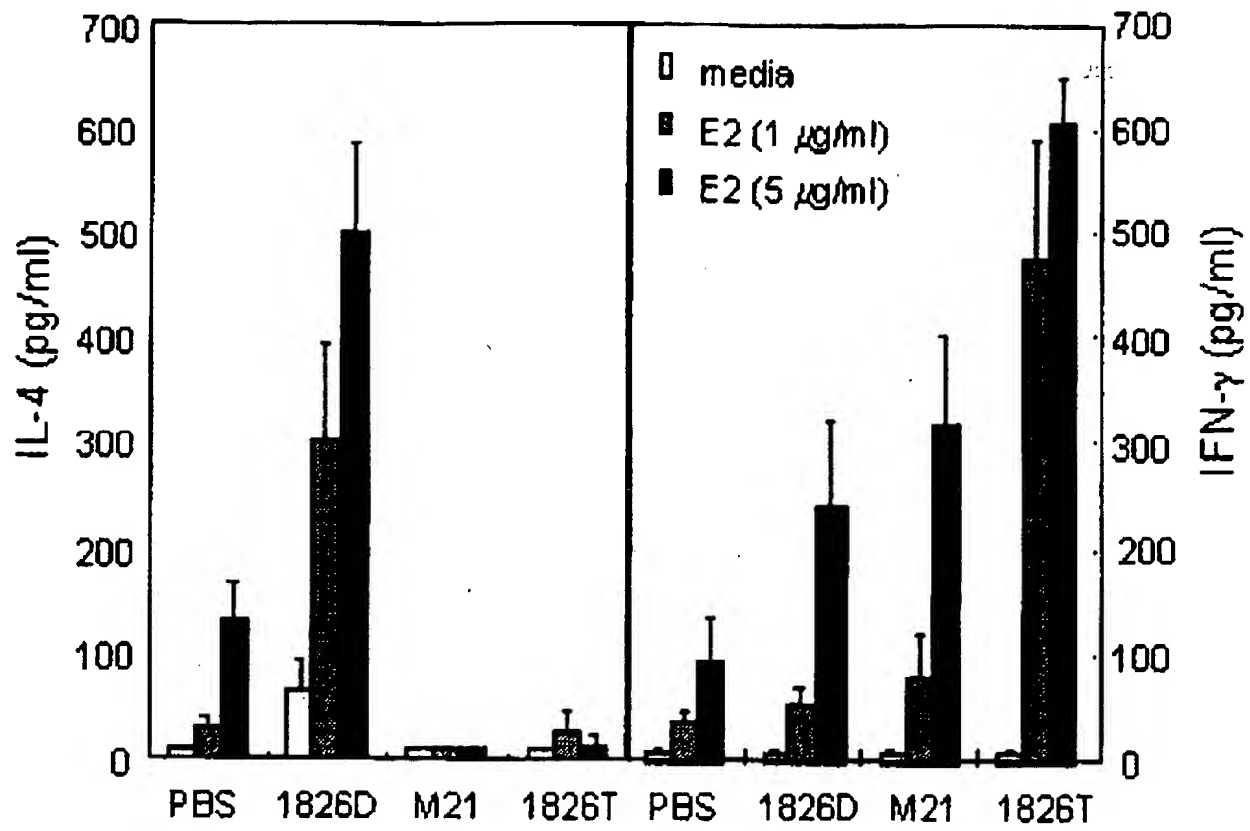


도면 4a



도면 4b





- < 110 Genexine Inc.
- >
- < 120 Modified phosphodiester CpG oligonucleotides conjugated with a dG run which have improved imm
- > unomodulatory activity and safety
- < 130 9P -11 -26
- >
- < 160 17
- >
- < 170 KOPATIN 1.5
- >
- < 210 1
- >
- < 211 20
- >
- < 212 DNA
- >
- < 213 Artificial Sequence
- >
- < 220
- >

```

< 223 synthetic CpG oligonucleotide with a phosphorothioate backbone
>
< 400 1
>
tccatgacgt tctgacgtt
< 210 2
>
< 211 20
>
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 p19
>
which is a phosph oligon havin a CpG motif and a 3
             hodie ucleo g
             ster tide
putative dG run(GGGGCG correspondin to 2293
              ). g
-
of a mpicillin resistant gene derived from pUC 2312 19
< 400 2
>
ggaaaacgtt cttcggggcg
< 210 3
>
< 211 14
>
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 p19d which is a phosphodiester oligonucleotide having a CpG motif
>
< 400 3
>
ggaaaacgtt cttc
< 210 4
>
< 211 20
>
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>

```


< 220
 >
 < 223 M1 which is a phosphodiester oligonucleotide having GpC sequence instead of CpG within the CpG
 > motif of p19
 < 400 4
 >
 ggaaaagctt cttcggggcg 20
 < 210 5
 >
 < 211 20
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence
 >
 < 220
 >
 < 223 M7 wherein GCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d
 >
 < 400 5
 >
 ggaaaacgtt cttcgccccg 20
 < 210 6
 >
 < 211 20
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence
 >
 < 220
 >
 < 223 M13 wherein GGCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d
 >
 < 400 6
 >
 ggaaaacgtt cttcggggcg 20
 < 210 7
 >
 < 211 20
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence
 >
 < 220
 >
 < 223 M14 wherein GGCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d
 >
 < 400 7
 >

ggaaaacgtt cttcgcccg

20

< 210 8

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M15 wherein GGCGCG is conjugated to 3' terminus of p19d

>

< 400 8

>

ggaaaacgtt cttcggcgcg

20

< 210 9

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M16 wherein GGGGGG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 9

>

ggaaaacgtt cttcgggggg

20

< 210 10

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M19 wherein GG is conjugated to the 5' terminus and GCCC is conjugated to the 3' terminus of p

> 19d

< 400 10

>

ggggaaaacg ttctcgccc

20

< 210 11

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M26 wherein GG is conjugated to the 5' terminus of 3'CC -deleted M 19

>

< 400 11

>

ggggggaaaa cgttcttcgc

20

< 210 12

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M27 wherein GGGGG is conjugated to the 5' terminus of 3'CGCCC -del eted M19

>

< 400 12

>

ggggggggga aaacgttctt

20

< 210 13

>

< 211 26

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M20 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of 1826D

>

< 400 13

>

ggggggtcca tgacgttctt gacgtt

26

< 210 14

>

< 211 26

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M21 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of 1826D

>

< 400 14

>

tccatgacgt tcctgacgtt gggggg

26

< 210 15

>

< 211 11

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M12 which is a phosphodiester oligonucleotide having a single CpG motif

>

< 400 15

>

cttaacgttc t

11

< 210 16

>

< 211 17

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M22 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of M12

>

< 400 16

>

cttaacgttc tggggggg

17

< 210 17

>

< 211 17

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M23 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of M12

>

< 400 17

>

ggggggctta acgttct

17